

アセトニトリル使用量削減対策 —有機溶媒の変更—

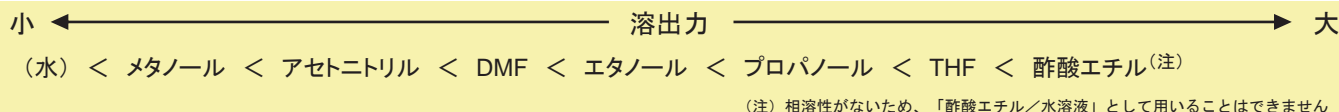
F090219A

アセトニトリルの使用量削減対策として、他の有機溶媒へ変更する際の手順や注意点について、フラボノイド類の分析を例にご紹介します。

有機溶媒を変更する際の目安

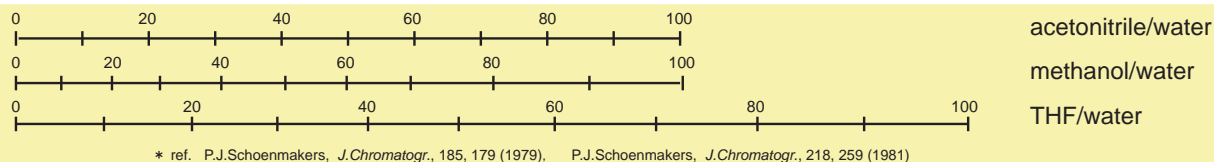
有機溶媒はそれぞれ溶媒強度が異なるため、溶出力に違いが生じます。

逆相モードで一般的に用いられる有機溶媒とその溶出力の順を下記に示します(※)。



有機溶媒を変更する場合、それぞれの溶出力や特性に応じて混合比を調整する必要があります。

逆相モードで特に多用されるアセトニトリル、メタノール、THFについて、各有機溶媒と水の混合比と相対的な溶媒強度を下記に示します。垂直方向で同一の溶媒強度を有していることを表しています(※)。

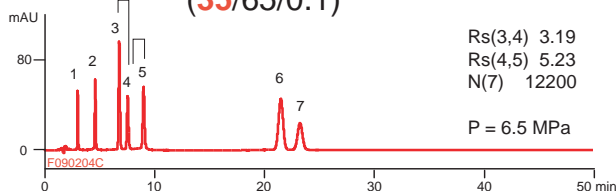


(※) 有機溶媒と水溶液の混合比や分析対象化合物の溶解性などによっては、必ずしもこの限りではありません

有機溶媒の変更—1；アセトニトリルからメタノールへ変更する

既存メソッド

acetonitrile/water/formic acid
(35/65/0.1)



有機溶媒をアセトニトリルからメタノールへ変更した例を示します。

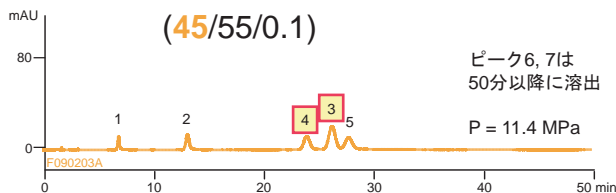
既存メソッドがアセトニトリル比率35%であることから、上図の相対溶媒強度を目安に、まずはメタノール比率を45%に変更して分析を行いました。

溶媒の特性の違いにより、ピーク3と4の溶出順が逆転しています。このように有機溶媒を変更した際には保持時間や分離度のみならず、溶出順が変化する場合もあるため、必ず各化合物において同定を行ってください。

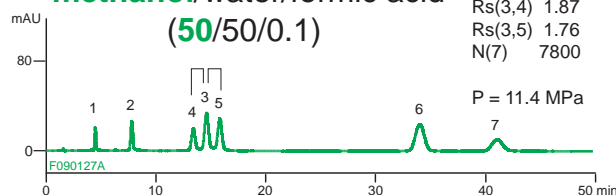
また、アセトニトリルと比較してメタノールの方が粘性が高いため、カラム圧力は高くなります。カラムおよびシステムの最大使用圧力を超えないよう、必要に応じて流量を調整して下さい。

(今回はカラムおよびシステムの最大使用圧力を十分下回するため、流量の調整は行っていません。)

methanol/water/formic acid
(45/55/0.1)



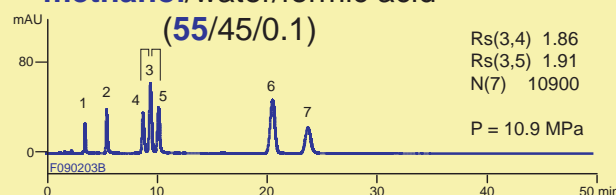
methanol/water/formic acid
(50/50/0.1)



メタノール比率45%では50分経過してもピーク6, 7が溶出していないため、さらにメタノール比率を50%, 55%と高めて分析時間の短縮を図りました。

メタノール比率55%において、分析時間は既存メソッドと同等の25分以内となり、一部の分離度は若干劣るものの、全てのピークがベースライン分離しています。

methanol/water/formic acid
(55/45/0.1)



Column : YMC-Pack Pro C18 (5 μm, 12 nm)
150 X 4.6 mm.I.D.
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV at 260 nm

1. Myricetin 5. Baicalein
2. Quercetin 6. Chrysin
3. Apigenin 7. Acacetin
4. Kaempferol

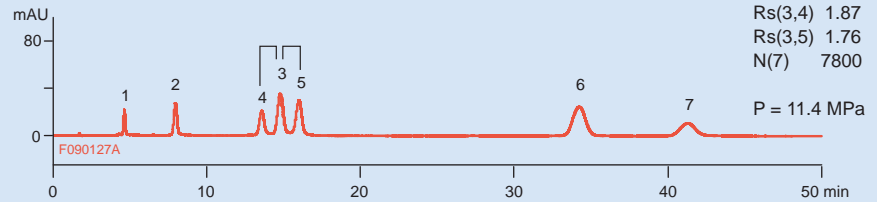
有機溶媒の変更-2 ; メタノールに第2の有機溶媒を添加する

アセトニトリルからメタノールに変更した際、メタノール比率の調整のみでは「目的の分離度が得られない」、「1分析あたりの分析時間が長くなってしまふ」などの問題が生じることがあります。この場合、メタノール以外の有機溶媒に変更することも可能ですが、分離パターンの大きな変化などによって、さらに多くの検討を要することも少なくありません。

そこで次の検討段階として、メタノールに第2の有機溶媒を添加し、分離最適化を図ることも一案です。メタノールとは異なる特性の有機溶媒を添加することによって、溶出力および分離選択性が変化し、分離度の改善や分析時間の短縮が可能となる場合があります。

有機溶媒にメタノールのみを使用したフラボノイド分析例

methanol/water/formic acid
(50/50/0.1)



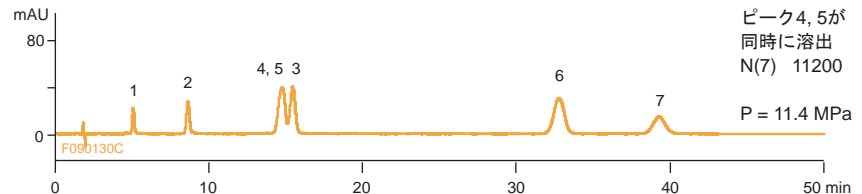
上図クロマトグラムの分析条件をもとに、全体の有機溶媒比率50%のうち、メタノール比率を45%、添加する有機溶媒比率を5%として、検討を行った例を以下に示します。

今回の例では、有機溶媒にメタノールのみを使用した場合よりも、酢酸エチルやTHFを添加した場合において、分離度の向上および分析時間の短縮が可能となっています。

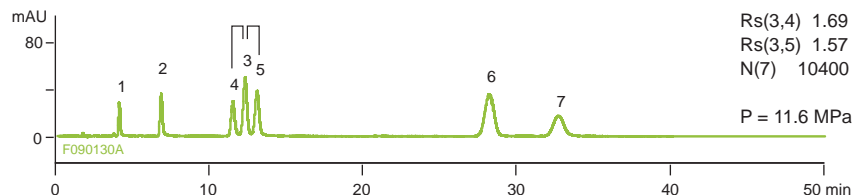
Eluent : methanol/添加溶媒/water/formic acid (45/5/50/0.1)

添加溶媒

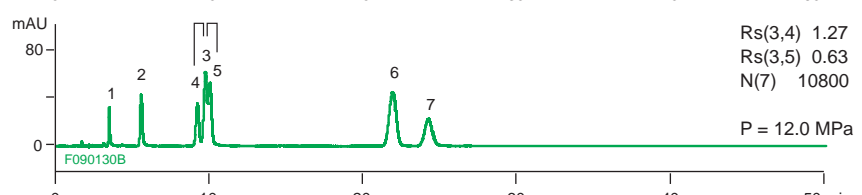
N,N-dimethylformamide
(DMF)



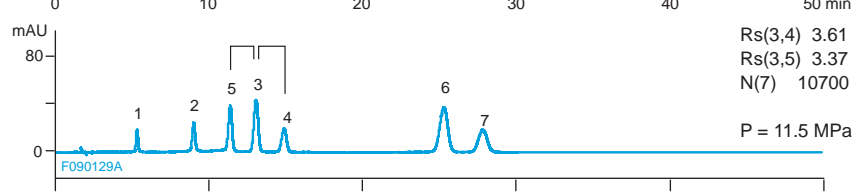
ethanol



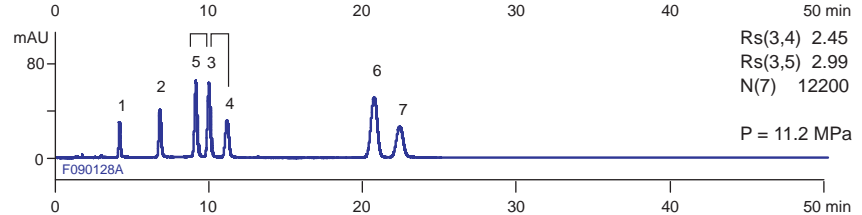
2-propanol



tetrahydrofran
(THF)



ethyl acetate



Column : YMC-Pack Pro C18 (5 μ m, 12 nm)
150 X 4.6 mm I.D.
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV at 260 nm

1. Myricetin 5. Baicalein
2. Quercetin 6. Chrysin
3. Apigenin 7. Acacetin
4. Kaempferol

アセトニトリルから他の有機溶媒に変更する場合、逆相モードではアセトニトリルと共に多用されるメタノールが第一選択肢となります。メタノール比率の調整のみで分離最適化が困難な場合には、アセトニトリルからメタノールへの変更に加え、異なる有機溶媒を添加する方法も有効です。